

Nutritional interventions to promote post-exercise muscle protein synthesis

Citation for published version (APA):

Koopman, R. (2006). *Nutritional interventions to promote post-exercise muscle protein synthesis*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20060622rk>

Document status and date:

Published: 01/01/2006

DOI:

[10.26481/dis.20060622rk](https://doi.org/10.26481/dis.20060622rk)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Skeletal muscle is one of the major organs involved in metabolism. Aging and chronic metabolic diseases, like type 2 diabetes, are generally associated with a significant loss of skeletal muscle mass. Muscle wasting eventually leads to muscle weakness and major disabilities in day-to-day life. Therefore, various interventions have been proposed to reduce or reverse the loss of muscle mass and function. Most attention so far was paid to endurance type of exercise. In this thesis we focus on the beneficial effects of resistance exercise and the proposed importance of the ingestion of carbohydrate, protein and/or specific amino acids as a means to augment muscle protein anabolism.

In **chapter 2**, we report that a single resistance exercise session can improve whole-body insulin sensitivity by as much as 15% when measured 24h after cessation of exercise. The latter tends to be of a similar magnitude as the ~20% improvement that has been reported in literature following an acute (~60 min) bout of endurance exercise. The presented data indicate that there should be no restriction in combining the benefits of both types of exercise in future lifestyle intervention programs. The greater whole-body insulin sensitivity following endurance exercise has been associated with the reduction of muscle substrate sources following exercise. However, information on the metabolic demands of resistance exercise is scarce. In **chapter 3**, it is shown that mixed muscle glycogen content is substantially decreased following a single resistance exercise session. These changes in muscle glycogen are shown to be fiber-type specific, and tend to be more pronounced in type IIx muscle fibers compared to type I muscle fibers. Furthermore, intramyocellular lipid content is reduced in the type I muscle fibers only and returns to baseline values within 2h of post-exercise recovery. The absence of a prolonged net reduction in skeletal muscle lipid content implies that the reported stimulating effects of resistance exercise on whole-body insulin sensitivity is unlikely to be attributed to a temporary reduction in intramyocellular lipid content.

In **chapters 4, 5 and 6** the effects of exercise or activities of daily living and nutrition on protein metabolism are evaluated. In these studies, continuous infusions of labeled amino acids are applied to measure their rate of appearance and/or disappearance in blood. With this method we can estimate protein breakdown, synthesis, oxidation and net-balance on a whole-body level. In **chapters 5 and 6** we also measure the rate of incorporation of a labeled amino acid into skeletal muscle protein to directly assess mixed muscle protein synthesis rates.

In **chapter 4**, different tracer methods are compared with the intention to assess whole-body protein turnover, during and following 6h of prolonged endurance exercise when carbohydrate or carbohydrate and protein are ingested. Discrepancies are shown when applying [$^2\text{H}_5$]phenylalanine and/or [^{15}N]urea and the [$1\text{-}^{13}\text{C}$]leucine tracer methods during exercise. These discrepancies are likely attributed to the fact that during exercise the uptake and oxidation of leucine is increased several fold. Therefore, leucine is likely not representative of the fate of the other essential amino acids during exercise. With phenylalanine and urea as tracers it is demonstrated that net protein degradation does not increase during moderate intensity exercise when carbohydrate is ingested. However, under these

conditions, protein net balance remains negative. The combined ingestion of carbohydrate and protein is shown to improve net protein balance at rest, during exercise and post-exercise recovery.

In **chapters 5** and **6** the effects of amino acid and/or protein (hydrolysate) ingestion on muscle protein synthesis are investigated. The combined ingestion of carbohydrate, protein and leucine stimulates protein anabolism in several ways. It provides amino acids as precursors for protein synthesis and elicits a strong insulinotropic response. In addition, in animal models, leucine has been shown to stimulate protein synthesis by an insulin-independent mechanism. In **chapter 5**, it is shown that the combined ingestion of carbohydrate ($0.3 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$), protein hydrolysate ($0.2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) and leucine ($0.1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) following resistance exercise substantially augments the plasma insulin response. The combined ingestion of this mixture reduces whole-body protein breakdown and oxidation rates and increases protein synthesis rates. The net protein balance is negative when only carbohydrate is ingested, positive with carbohydrate and protein and improves further following the combined ingestion of carbohydrate, protein and leucine. In addition, muscle protein synthesis rates are shown to be significantly higher when carbohydrate, protein and leucine are ingested. These data suggest that the additional ingestion of free leucine in combination with protein and carbohydrate likely represents an effective strategy to increase muscle protein anabolism following resistance exercise.

The progressive loss of skeletal muscle mass with aging, or sarcopenia, is partly attributed to a disruption in the regulation of skeletal muscle protein turnover. The anabolic effect of food intake on muscle protein synthesis seems to be blunted in the elderly. The latter has been proposed to play a key-role in the etiology of sarcopenia. In **chapter 6**, potential differences in the response to the ingestion of carbohydrate ($0.49 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) with or without protein hydrolysate ($0.16 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) and free leucine ($0.03 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) following simulated activities of daily living (ADL) on whole-body protein balance and mixed muscle protein synthesis rates are investigated in both young and elderly men. Whole-body phenylalanine and tyrosine fluxes are shown to be significantly higher in the young versus the elderly, indicative of a slower protein turnover rate in the elderly. Protein balance is shown to be negative when only carbohydrate is ingested, but positive when both protein and leucine are co-ingested in both groups. Muscle protein synthesis rates are shown to be substantially lower in elderly compared with young adults when only carbohydrates are ingested. Combined ingestion of protein hydrolysate and leucine with carbohydrate increases muscle protein synthesis rates and improves net protein balance to the same extent in young and elderly men. These data indicate that the anabolic properties of this nutritional intervention are equally effective in young and elderly men.

The rate of muscle protein synthesis is regulated in part by the process of mRNA translation initiation. The latter has been shown to be regulated by the phosphatidylinositol 3 kinase signaling pathway, with major regulatory roles for the mammalian target of rapamycin (mTOR), S6 protein kinase 1 (S6K1) and the eukaryotic initiation factor 4E-binding protein (4E-BP1). In **chapter 7**, the effects

of a single session of resistance exercise on the phosphorylation status of several proteins involved in the regulation of muscle protein synthesis are assessed. In addition, it is observed that changes in the phosphorylation status are muscle fiber-type specific. Resistance exercise results in a strong activation of AMP activated kinase (AMPK), while 4E-BP1 phosphorylation is reduced, suggesting that translation initiation is blunted immediately following resistance exercise. During recovery, S6K1 phosphorylation increases but this is shown to occur predominantly in the fast twitch type II muscle fibers. The observation that S6 phosphorylation does not substantially change when subjects remain fasted implies that the ingestion of protein/amino acids is essential to fully activate the translational machinery.

In the final chapter, the significance and clinical relevance of the acquired data are discussed and important aims for future research are defined. In addition, specific methodological issues that need to be considered in future studies are also mentioned.

In summary, resistance exercise reduces muscle glycogen stores in a fiber-type specific manner, which could partly be responsible for the observed increase in insulin sensitivity following exercise. Although resistance exercise increases S6K1 phosphorylation in a fiber-type specific manner, S6 phosphorylation does not increase under fasting conditions. The latter indicates that food intake following exercise is needed to fully activate mRNA translation initiation and muscle protein synthesis. In contrast to common belief, endurance exercise does not increase protein degradation and oxidation when only carbohydrates are ingested. However, the intake of protein/amino acids is necessary to attain a net positive protein balance. Amino acids do not only serve as building blocks for *de novo* protein synthesis. Amino acids, and leucine in particular, seem to be able to function as signaling molecules with an important regulatory role in muscle protein metabolism. The combined intake of leucine and protein hydrolysates with carbohydrate following resistance exercise can effectively stimulate muscle protein synthesis. These observations have led to the hypothesis that physical activity followed by the ingestion of leucine with protein hydrolysate and carbohydrate could represent an effective strategy to reduce or counteract the loss of muscle tissue that occurs with aging. Co-ingestion of protein hydrolysate and leucine substantially increases mixed muscle protein synthesis rates to the same level in the young and elderly, thereby improving whole-body protein balance. The present data indicate that the combined ingestion of carbohydrate, protein and leucine represents an effective strategy to increase muscle protein anabolism following resistance exercise or ADL activities in young and elderly humans.

Samenvatting

De skeletspier is één van de belangrijkste organen die betrokken is bij de regulatie van het metabolisme. Veroudering en chronische metabole ziekten zoals diabetes zijn geassocieerd met een sterk verlies aan spiermassa. Dit heeft tot gevolg dat spierkracht en uithoudingsvermogen afneemt, waardoor de functionele capaciteit van de patiënt achteruit gaat. Om deze afname van de spiermassa tegen te gaan zijn verschillende interventies voorgesteld. Tot nu toe is er vooral aandacht geweest van de effecten van duurtrainingen. In dit proefschrift wordt aandacht besteed aan de voordelen van het uitvoeren van krachttraining en de mogelijkheden van de gecombineerde inname van koolhydraten, eiwithydrolysaten en leucine om de spieraanwas te stimuleren.

In **hoofdstuk 2** wordt aangetoond dat de insuline gevoeligheid, 24 uur na één enkele krachttraining met ongeveer 15% kan worden verbeterd. Dit is vergelijkbaar met de resultaten die gerapporteerd worden na het uitvoeren van één enkele duurtraining. De uitkomsten van deze studie geven dus aan dat er geen beperking behoeft te bestaan in het implementeren van beide vormen van inspanning in toekomstige interventieprogramma's. De verbeterde insuline gevoeligheid na inspanning wordt vaak geassocieerd met het gebruik van substraatvoorraden in de spier tijdens inspanning. Echter, er is eigenlijk nauwelijks iets bekend over hoeveel van die voorraden tijdens krachttraining gebruik wordt. In **hoofdstuk 3** wordt aangetoond dat de spierglycogeen voorraad sterk gedaald is na een krachttrainings-sessie. De verlaging in glycogeen voorraad blijkt daarnaast spiervezelspecifiek te zijn. De daling is namelijk groter in de snelle type IIx vezels in vergelijking met de langzamere type I vezels. Verder daalt ook de vetvoorraad in de spiervezels. Dit gebeurt echter selectief in de langzame vezels (type I) en 2 uur na inspanning is de vetvoorraad alweer aangevuld tot basale hoeveelheden. Het feit dat de vetvoorraden in de spier na krachttraining niet verlaagd worden voor langere tijd, geeft aan dat de gerapporteerde toename in insuline gevoeligheid na dit soort inspanning niet kan worden toegeschreven aan een daling in vetvoorraden in de spier.

In de **hoofdstukken 4, 5 en 6** zijn de effecten van fysieke inspanning en voedingsinterventies op het eiwitmetabolisme bestudeerd. In deze studies worden proefpersonen geïnfuseerd met gelabelde aminozuren. Op de wijze kan bepaald worden hoe snel aminozuren in het bloed verschijnen en hoe snel ze in weefsels verdwijnen. Met behulp van deze techniek kan op heel lichaamsniveau de eiwitaanmaak, afbraak, oxidatie en de netto balans uitgerekend worden. In **hoofdstuk 5 en 6** is ook nog gemeten hoe snel het gelabelde aminozuur wordt ingebouwd in spierweefsel om op die manier de snelheid te kunnen bepalen waarmee spiereiwit wordt aangemaakt.

In **hoofdstuk 4** worden verschillende gelabelde aminozuren (tracers) gebruikt om het eiwitmetabolisme voor, tijdens en na een 6 uur lange duurtraining in kaart te kunnen brengen terwijl de proefpersonen continue koolhydraten of koolhydraten en eiwitten innamen. Er bestaan duidelijke verschillen in de uitkomsten die verkregen zijn met de [$^2\text{H}_5$]phenylalanine en [^{15}N]ureum tracer vergeleken met de [$1\text{-}^{13}\text{C}$]leucine tracer tijdens inspanning. Dit verschil wordt waarschijnlijk veroorzaakt door het feit dat de leucine opname en oxidatie tijdens inspanning

sterk verhoogd wordt, terwijl dat met andere aminozuren niet gebeurt. Hierdoor is leucine niet representatief voor het lot van de andere essentiële aminozuren tijdens inspanning. Met de phenylalanine en ureum tracers is aangetoond dat tijdens ultra lange duurinspanning de eiwitaafbraak en oxidatie niet verhoogd is wanneer koolhydraten worden ingenomen gedurende de inspanning. Echter onder deze condities is de netto eiwitbalans negatief. Uit deze studie blijkt dat de inname van een koolhydraat en eiwitmengsel ervoor zorgt dat de netto eiwitbalans sterk positief wordt.

In de **hoofdstukken 5 en 6** wordt het effect van de inname van eiwit/aminozuren op de spiereiwietsynthese bepaald. Deze inname van een mengsel met koolhydraten, eiwithydrolysaten en leucine kan op verschillende manieren de eiwitaanmaak stimuleren. Het levert bouwstenen (aminozuren) voor de aanmaak van eiwit en kan de insuline afgifte door de alveesklier sterk verhogen. Verder blijkt uit dierenonderzoek dat het essentiële aminozuur leucine de unieke eigenschap heeft om direct de eiwietsynthese te stimuleren via een insuline onafhankelijk mechanisme. In **hoofdstuk 5** wordt aangetoond dat de gecombineerde inname van koolhydraten (0.3 g/kg/u), eiwit (0.2 g/kg/u) en leucine (0.1 g/kg/u) na een krachttraining leidt tot een sterke stijging in de plasma insuline concentratie, wanneer deze wordt vergeleken met de inname van koolhydraat met of zonder eiwit. De eiwitaafbraak en oxidatie wordt verlaagd terwijl de eiwitaanmaak wordt verhoogd na de inname van de koolhydraat, eiwit en leucine drank. De netto eiwitbalans op heel lichaamsniveau is negatief wanneer alleen koolhydraten worden ingenomen, positief wanneer eiwithydrolysaat aan de drank wordt toegevoegd en nog verder verhoogd wanneer ook leucine wordt toegevoegd. De spiereiwietsynthese is significant hoger wanneer koolhydraat, eiwithydrolysaat en leucine wordt ingenomen vergeleken met de inname van koolhydraten alleen. Deze data lijkt te suggereren dat de inname van eiwithydrolysaat en leucine met koolhydraten een effectieve strategie is om de spiereiwitaanmaak te verhogen na krachttraining.

Het verlies van spiermassa dat optreedt naarmate men ouder wordt, ook wel sarcopenie genoemd, wordt gedeeltelijk veroorzaakt door een verstoorde regulatie van de spiereiwietsynthese en afbraak. Bijvoorbeeld, het stimulerende effect van voedselinname op de spiereiwietsynthese lijkt bij ouderen verminderd te zijn. Dit wordt gezien als een van de belangrijkste factoren in de etiologie van sarcopenie. In **hoofdstuk 6** wordt gekeken of er verschillen zijn in eiwit balans en spiereiwietsynthese na normale dagelijkse activiteiten met de inname van koolhydraten (0.49 g/kg/u) met of zonder eiwithydrolysaat (0.16 g/kg/u) en vrije leucine (0.03 g/kg/u) tussen oudere (± 75 jaar) en jongere (± 21 jaar) mensen. De flux van phenylalanine en tyrosine blijkt lager te zijn in de ouderen wat impliceert dat de eiwitturnover (aanmaak en afbraak) lager is in de oudere proefpersonen. Wanneer alleen koolhydraten worden ingenomen is de eiwitbalans op heel lichaamsniveau negatief, terwijl hij positief is na de inname van leucine en eiwit met koolhydraten. De spiereiwietsynthese is significant lager in de oudere personen in vergelijking met de jongeren. De gecombineerde inname van eiwit en leucine met koolhydraten verhoogt de eiwietsynthese snelheid in zowel de jongeren als de

ouderen. Sterker nog, de spiereiwitaanmaak wordt net zo sterk gestimuleerd door de inname van deze drank in de ouderen als in de jongeren. Dit betekent dat de anabole capaciteit van deze voedingsinterventie net zo groot is in ouderen als in jongeren.

De snelheid van spiereiwitaanmaak wordt gereguleerd door een proces genaamd translatie initiatie dat ervoor zorgt dat begonnen kan worden met het aflezen van mRNA en daarna eiwit gevormd kan worden. Dit proces wordt gereguleerd door de phosphatidylinositol-3 kinase signaalcascade. De belangrijkste enzymen/kinases in deze keten zijn de proteïne kinase mTOR, S6 proteïne kinase 1 (S6K1) en eukaryotische initiatie factor 4E-bindingsproteïne (4E-BP1). In **hoofdstuk 7** wordt het effect van één enkele krachttraining op de fosforylatiestatus van verschillende eiwitten gemeten die betrokken zijn in de regulatie van de spiereiwitsynthese snelheid. Het blijkt dat veranderingen in fosforylatie van S6K1 spiervezeltype afhankelijk zijn. Deze fosforylatie treedt vooral op in snelle type II spiervezels. De krachttraining resulteert in een sterke activering van de AMP geactiveerde kinase (AMPK), terwijl 4E-BP1 fosforylatie verlaagd is. Dit impliceert dat direct na inspanning translatie initiatie geremd is. Gedurende het herstel neemt de mate van S6K1 fosforylatie toe, terwijl de fosforylatie van S6 niet verandert wanneer proefpersonen nuchter blijven. Deze data suggereert dat de inname van voldoende eiwitten nodig is om de translatie initiatie optimaal te laten verlopen.

In het laatste hoofdstuk wordt het belang van de behaalde onderzoeksresultaten besproken en hun klinische relevantie voor de oudere populatie bediscussieerd. Verder worden belangrijke doelen voor toekomstig onderzoek gedefinieerd. Ook worden specifieke methodologische problemen waarmee rekening moet worden gehouden in toekomstig onderzoek aangehaald.

Samenvattend, krachttraining leidt tot een spiervezelspecifieke verlaging van de glycogeenvoorraad in de spier, wat gedeeltelijk verantwoordelijk is voor de verhoogde insuline gevoeligheid na inspanning. Hoewel krachttraining de fosforylatie van S6K1 verhoogt op een spiervezelspecifieke manier, blijft de fosforylatie van S6 onveranderd wanneer men gevast blijft. Dit geeft aan dat de inname van voedsel na het sporten essentieel is om de mRNA translatie initiatie en de aanmaak van spiereiwit volledig te activeren. Hoewel over het algemeen gedacht wordt dat duurtraining leidt tot een toegenomen eiwit afbraak en oxidatie, blijkt dit niet het geval te zijn wanneer koolhydraten worden ingenomen. Om een positieve netto eiwitbalans te verkrijgen moet men naast koolhydraten echter ook eiwitten/aminozuren innemen. Aminozuren vormen niet alleen de bouwstenen voor nieuwe eiwitten, ze kunnen ook functioneren als signaal moleculen die een belangrijke regulerende rol in het eiwitmetabolisme kunnen spelen. Dit geldt vooral voor het aminozuur leucine. De gecombineerde inname van leucine, eiwithydrolysaat en koolhydraten na een krachttraining blijkt effectief in het stimuleren van de spiereiwitsynthese. Deze observatie heeft tot de hypothese geleid dat fysieke activiteit gevolgd door de inname van leucine, eiwit en koolhydraten een effectieve strategie kan zijn om het verlies van spiermassa bij ouderen te verminderen of te voorkomen. Het blijkt dat de gecombineerde inname van

leucine, eiwit en koolhydraten de spiereiwit-aanmaak in jongeren en ouderen in dezelfde mate stimuleert, wat leidt tot een verbeterde netto eiwit balans. Deze data geven aan dat de gecombineerde inname van leucine, eiwit en koolhydraten een effectieve strategie is om de spiereiwit-aanmaak te stimuleren in de eerste uren na een krachttraining of in de periode na een verhoogd dagelijkse activiteiten patroon in jonge en oudere mensen.